

JPO00/4167

ETU

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/04167

10/030298

23.06.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

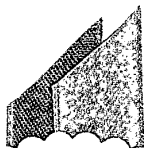
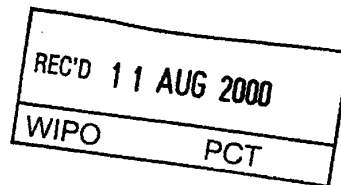
2000年 3月21日

出願番号
Application Number:

特願2000-079171

出願人
Applicant(s):

塩野義製薬株式会社

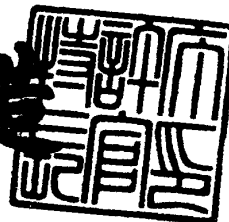


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

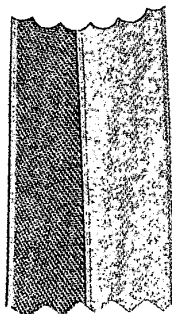
2000年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058548



【書類名】 特許願

【整理番号】 J199137580

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成12年 3月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17 ACV

【発明者】

 【住所又は居所】 宮崎県宮崎市大字恒久 9 4 0 バンベールハウス A - 4
 0 1 号

 【氏名】 柳田 俊彦

【特許出願人】

 【識別番号】 000001926

 【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100078282

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 山本 秀策

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 平成11年特許願第177548号

 【出願日】 平成11年 6月23日

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 001878

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9710842

特 2 0 0 0 - 0 7 9 1 7 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 子宮筋収縮抑制薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アドレノメデュリンを含有する、子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための組成物。

【請求項 2】 早産を予防するために用いられる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】 流産を予防するために用いられる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】 帝王切開前に分娩を停止するために用いられる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】 月経困難症を治療するために用いられる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】 前記アドレノメデュリンが、
(a) 配列表の配列番号 2 の 1 3 位の S e r から 5 2 位の T y r までのアミノ酸配列を有するペプチド、または、
(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチドである、
請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】 前記アドレノメデュリンが、
(c) 配列の配列番号 2 の 1 位の T y r から 5 2 位の T y r までのアミノ酸配列を有するペプチド、または、
(d) アミノ酸配列 (c) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチドである、
請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】 前記アドレノメデュリンが、
(e) 配列表の配列番号 2 の - 7 3 位の A l a から 5 2 位の T y r までのアミノ

酸配列を有するペプチド、または、

(f) アミノ酸配列 (e) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチドである、

請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】 前記アドレノメデュリンが、

(g) 配列表の配列番号 2 の - 9 4 位の M e t から 9 1 位の L e u までのアミノ酸配列を有するペプチド、または、

(h) アミノ酸配列 (g) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチドである、

請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 1 0】 前記アドレノメデュリンの C 末端がアミド化されている、請求項 1 および 6 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 1】 前記アドレノメデュリンの C 末端に G l y が付加されている、請求項 1 および 6 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 2】 前記アドレノメデュリンにおいて、配列表の配列番号 2 の 1 6 位の C y s と 2 1 位の C y s とが、架橋されている、請求項 1 および 6 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 3】 前記架橋が、ジスルフィド結合である、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】 前記架橋が、 $-CH_2-CH_2-$ 結合である、請求項 1 2 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アドレノメデュリンを含有する、子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための組成物に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

産科の分野で最も重要な問題の一つは早産の管理である。妊娠 22 週以後から 37 週未満の分娩を早産といい、全分娩の 5～10% を占める。早産により分娩された新生児を早産児といい、低出生体重児であることが多い。近年、新生児管理は著しく進歩したとはいえ、早産児は正常分娩された新生児と比較して罹患率および死亡率が高いので、可能な限り妊娠状態を維持して早産を予防することが望ましい。

【0003】

現在広範に用いられている早産予防薬としては、 β_2 -アドレナリン作用性の交感神経作用薬、硫酸マグネシウム、およびインドメサシン（プロスタグランジン合成阻害剤）などが公知である。

【0004】

代表的な β_2 -アドレナリン作用性作用薬であるリトドリンは、母体に、頻脈、レニン分泌の増大、高血糖症（および新生児の低血糖症）を含む種々の心血管性および代謝性の副作用を引き起こす。テルブタリンおよびアルブテロールを含む他の β_2 -作用性作用薬は、リトドリンと同様の副作用を有する。

【0005】

4～8 mg/dL の治療範囲を超える血漿濃度の硫酸マグネシウムは、心臓伝導および神経筋伝達の阻害、呼吸低下、ならびに心停止を引き起こし、従って腎機能が損なわれた場合には、この薬剤は好適ではなくなる。

【0006】

インドメサシンは、胎児の肺動脈高血圧症、動脈管開存異常などの胎児副作用があるので、大量使用および長期使用は禁忌である。

【0007】

このように、現在公知の早産予防薬は種々の欠点を有する。それゆえ、これらの欠点を有さない、新規な早産予防薬が望まれている。

【0008】

分娩の開始、すなわち陣痛発来 of 機序は、いまだ完全には解明されていないが、子宮収縮作用をもつオキシトシン、プロスタグランジンなどの関与が示唆され

ている。ブラジキニンもオキシトシンおよびプロスタグランジンと同様に、子宮収縮作用を有するが、その生理的、あるいは病態生理的な意義については、未だ不明である。しかし、ブラジキニンは本来、炎症性のメディエーターであり、妊娠子宮における異常な増加が早産、流産を引き起こす可能性が示唆されている（文献1；文献リストは本書末尾に記載する）。そのため、子宮筋の自動収縮を選択的に抑制し得る薬剤、またはブラジキニンの子宮筋収縮作用を選択的に抑制し得る薬剤が見出されれば、早産を予防するためだけでなく、流産を予防するため、帝王切開前に分娩を停止するために有用であると考えられる。

【0009】

さらに、この薬剤は、月経困難症を治療するために有用であると考えられる。なぜなら、月経困難症は、排卵周期中の月経に関連する周期的痛みによって特徴付けられ、この痛みは、子宮の収縮および虚血に由来するものと考えられるからである。

【0010】

アドレノメデュリン（AM）は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）ファミリーの一員であり、当初、ヒト褐色細胞腫から降圧作用を有するペプチドとして単離された（文献2）。AMは、種々の組織において様々な役割を果たすことが知られている（文献3）。これは、AMの生体に対する作用機序が一樣ではないことを示唆する。

【0011】

メス生殖系（例えば、下垂体の後葉（文献3）および子宮（文献4）におけるAMタンパク質あるいはAM mRNAのレベルは、副腎髄質におけるレベルと同程度に高い。また、母体血液中の循環AMのレベル（文献5）ならびに胎児胎盤組織（文献6）および子宮（文献7）におけるAMおよびAM mRNAの量は、両方とも、正常な妊娠の間に上昇した。妊娠合併症の1つである妊娠中毒症では、母体の血漿AMレベルは変化しなかった（文献5）かまたは低下（文献8）したが、羊水および臍静脈中のAM含量は、正常妊娠（文献9）と比較して高かった。しかし、これらの胎児組織および母体組織におけるAMの生理学的役割およびAMの機能の詳細は、依然として不明である。

【0012】

AMの子宮収縮に与える影響については、AMが、 $5\mu\text{M}$ 以上の高濃度でのみガラニン（CGRPニューロンに含まれる神経ペプチド）による子宮の緊張性収縮を抑制すること、さらにその作用がCGRP〔8-37〕により消失することが、唯一報告されている（文献7）。しかし、ガラニンによる子宮収縮の意義が全く不明であること、また、AMの作用が、ナノモル（nM）オーダー以下の濃度（AMが作用しうる濃度として多くの論文で報告されている）ではみられず、マイクロモル（ μM ）オーダー以上という高濃度でしか確認できないことから、生理的なAMの作用を反映しているとは考えにくい。

【0013】

子宮の運動性（収縮／弛緩）は、交感神経、副交感神経による神経性の調節だけでなく、CGRP（文献10）や、一酸化窒素（NO）、オキシトシン、プロスタグランジン $\text{F}_2\alpha$ （ $\text{PGF}_2\alpha$ ；血圧上昇、血管収縮、腸管運動促進、子宮収縮、黄体退行促進、および気管支収縮作用を有し、分娩誘発剤として使用される代表的なプロスタグランジン）などの様々な物質により協調的に調節されている。また、前述のブラジキニンのように、異常収縮を引き起こし、早産の原因となりうるものも子宮の運動性に影響を与える。しかし、子宮の自動収縮、ならびにオキシトシン、 $\text{PGF}_2\alpha$ などの調節因子による収縮、あるいは、ブラジキニンによる収縮にAMがどのような影響を与えるかは、全く知られていない。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記問題点の解決を意図するものであり、子宮筋の自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制する新規な薬剤を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、もともと血圧降下作用を有するペプチドとして同定されたアドレノメデュリンが、子宮筋の自動収縮およびブラジキニンによる収縮を選択的に抑制する作用を有することを見出し、これに基づいて本発明を完成させた。

【 0 0 1 6 】

本発明の子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための組成物は、アドレノメデュリンを含有する。本発明の組成物は、早産を予防するため、流産を予防するため、帝王切開前に分娩を停止するため、または月経困難症を治療するために用いられ得る。

【 0 0 1 7 】

1つの実施態様において、上記アドレノメデュリンは、(a)配列表の配列番号1の13位のS e rから52位のT y rまでのアミノ酸配列を有するペプチド；(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチド；(c)配列表の配列番号1の1位のT y rから52位のT y rまでのアミノ酸配列を有するペプチド；(d)アミノ酸配列(c)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチド；(e)配列表の配列番号1の-73位のA l aから52位のT y rまでのアミノ酸配列を有するペプチド；(f)アミノ酸配列(e)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチド；(g)配列表の配列番号1の-94位のM e tから91位のL e uまでのアミノ酸配列を有するペプチド；または、(h)アミノ酸配列(g)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ選択的な子宮筋収縮抑制作用を有するペプチドを含む。

【 0 0 1 8 】

他の実施態様では、上記アドレノメデュリンのC末端は、アミド化されるか、またはG l yが付加され得る。

【 0 0 1 9 】

他の実施態様では、上記アドレノメデュリンにおいて、配列表の配列番号2の16位のC y sと21位のC y sとが架橋され得る。上記架橋は、ジスルフィド結合または-CH₂-CH₂-結合であり得る。

【 0 0 2 0 】

【発明の実施の形態】

本発明の実施においては、特に指示されない限り、当該分野で既知であるタンパク質の分離および分析法、組換えDNA技術、およびアッセイ方法が採用される。

【0021】

I. 定義

以下に、本発明を説明する上で用いられる用語を説明する。

【0022】

アドレノメデュリンは、上述のように、当初、血圧降下作用を有するペプチドとしてヒト褐色細胞腫から単離されたペプチドである。本発明において、用語「アドレノメデュリン」は、この特定のペプチドに限定されず、このペプチドに対してアミノ酸配列における実質的な相同性を有するペプチドもまた含んでいう。相同なペプチドの例として、種変異体、および対立遺伝子変異体がある。ヒト由来のアドレノメデュリンは、配列表の配列番号2の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。（配列表の配列番号2の-94位のMetから91位のLeuまでのアミノ酸配列からなるペプチドは、プレプロアドレノメデュリンと考えられる。シグナルペプチドがプロセシングされた配列表の配列番号2の-73位のAlaから91位のLeuまでのアミノ酸配列からなるペプチドは、プロアドレノメデュリンと考えられる。配列表の配列番号2の13位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなるペプチドは、血圧降下作用が確認されたアドレノメデュリンフラグメントである。これらのいずれの形態も、本発明において使用され得る。）ヒト由来のアドレノメデュリンは、配列表の配列番号1の447位のTから602位のCまでのポリヌクレオチド配列によりコードされ得る。ブタ由来のアドレノメデュリンの場合、配列表の配列番号4の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。ブタ由来のアドレノメデュリンは、配列表の配列番号3の430位のTから585位のCまでのポリヌクレオチド配列によりコードされ得る。ラット由来のアドレノメデュリンは、配列表の配列番号6の1位のTyrから50位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。ラット由来のアドレノメデュリンは、配列表の配列番号5の433位のTか

ら 5 8 2 位の T までのポリヌクレオチド配列によりコードされ得る。

【 0 0 2 3 】

ヒトの疾患または治療の目的において、ヒト由来のペプチドが好ましいことは明らかである。しかし、他の哺乳動物由来の相同なペプチドもまた目的に応じて使用可能である。さらに、他の哺乳動物由来のペプチドとの比較は、ヒト由来のペプチドの所望の活性が保持された改変体を得るうえで重要である。

【 0 0 2 4 】

本発明に用いられるアドレノメデュリンは、上記の配列によって必ずしも限定されることはなく、これらの配列に対して、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ所望の活性が保持された相同なペプチドも対象として含まれる。

【 0 0 2 5 】

アミノ酸の保存的置換は、相同なペプチドを得るための好ましい手段のひとつである。保存的置換は、代表的には以下のグループ内での置換を包含する：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

【 0 0 2 6 】

2 つのアミノ酸配列の間の相同性は、必要であればギャップを導入して、残基の適合を最適化することにより決定される。ヒトのアドレノメデュリンに実質的なアミノ酸配列相同性を有するペプチドは、ヒトのアドレノメデュリンのアミノ酸配列と、代表的には少なくとも約 6 0 %、好ましくは少なくとも約 7 0 %、そしてより好ましくは少なくとも約 8 0 % の相同性を有し、そして特に好ましい実施態様では、少なくとも約 9 0 % 以上の相同性を有する。相同性決定のためのソフトウェアは、容易に入手可能である。

【 0 0 2 7 】

本発明においては、定義上、下記の実施例 1 と実質的に同一の条件（AM の添加濃度は 1 0 0 nM とする）で測定したとき、子宮筋の自動収縮度が実施例 1 のコントロール区に示された値の約 9 0 % 以下、好ましくは約 8 0 % 以下であると

き、またはブラジキニンによる収縮度が実施例2のコントロール区に示された値の約90%以下、好ましくは約80%以下であるとき、「子宮筋収縮抑制作用を有する」という。

【0028】

本発明においては、定義上、下記の実施例1と実質的に同一の条件（AMの添加濃度は100 nMとする）で測定したとき、子宮筋の自動収縮度が実施例1のコントロール区に示された値の約90%より高い、好ましくは約95%以上であるとき；ブラジキニンによる収縮度が実施例2のコントロール区に示された値の約90%より高い、好ましくは約95%以上であるとき；またはオキシトシンもしくはプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ による収縮度が実施例4においてAM添加前に示された値の約90%より高い、好ましくは約95%以上であるとき収縮を「抑制しない」という。

【0029】

本発明においては、子宮筋の自動収縮またはブラジキニンによる収縮は抑制するが、オキシトシンおよびプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ による収縮は抑制しない場合に、「選択的な子宮筋収縮抑制作用を有する」という。

【0030】

本発明に用いられるペプチドのC末端は、アミド化されていても、されていなくてもよい。「C末端のアミド化」とは、ペプチドの修飾反応の1つをいい、ペプチドのC末端アミノ酸の $COOH$ 基が、 $CONH_2$ の形態になることをいう。生体内で作動する多くの生理活性ペプチドは、はじめ分子量のより大きな前駆体タンパク質として生合成され、これが細胞内移行の過程で、C末端アミド化のような修飾反応を受けて成熟する。アミド化は、C末端アミド化酵素が、前駆体タンパク質に作用することによって、行われる。前駆体タンパク質においては、アミド化される残基のC末端側には常にGly残基が存在し、さらにそのC末端側に、例えばLys-ArgあるいはArg-Argなどの塩基性アミノ酸配列対が続いていることが多い（文献11）。

【0031】

II. 子宮筋収縮抑制作用を有するアドレノメデュリン

本発明においては、アドレノメデュリンは、子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための組成物の有効成分として利用される。アドレノメデュリンは、天然の供給源から単離されたもの、組換えDNA技術を使用して産生したもの、または化学合成したものであり得る。

【 0 0 3 2 】

アドレノメデュリンを天然の供給源から単離する場合、例えば、以下のようにして精製し得る。アドレノメデュリンは、例えばまず、ヒト褐色細胞腫を破壊して得られる粗抽出物を、各種クロマトグラフィーにかけることによって精製され得る。その際、血小板cAMPの活性の上昇をモニターすることによって、目的のアドレノメデュリンを含むフラクションを得ることができる。アドレノメデュリンの単離および精製方法については、特開平7-196693号公報に記載される。

【 0 0 3 3 】

アドレノメデュリンを組換えDNA技術を使用して産生する場合、目的のペプチドをコードするDNA配列が、種々の組換え系を用いて発現される。発現ベクターの構築および適切なDNA配列を有する形質転換体の作製は、当該技術分野で公知の方法によって実施される。発現は、原核生物系または真核生物系で実施され得る。

【 0 0 3 4 】

原核生物宿主としては、E. coli、バチルス属菌、およびその他のバクテリアが用いられる。そのような原核生物には、複製部位と宿主に適合する制御配列とを含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、E. coliは、典型的には、E. coli由来のプラスミドである、pBR322の誘導体を用いて形質転換される。ここでの制御配列とは、転写開始のためのプロモーター、必要に応じてオペレーター、およびリボソーム結合部位配列を含むと定義される。この制御配列には、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系（文献12）、トリプトファンプロモーター系（文献13）、および λ 由来のP_LプロモーターおよびN遺伝子リボソーム結合部位（文献14）のような一般的に用いられているものが包含される。

【0035】

真核生物宿主としては、例えば酵母および哺乳動物細胞が用いられ得る。このような真核生物には、複製部位と宿主に適合する制御配列とを含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、酵母は、pYEUra3 (Clontech) を用いて形質転換される。その他に、真核生物宿主で有用なプロモーターには、例えば糖分解酵素を合成するためのプロモーター（例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター（文献15）；エノラーゼ遺伝子由来のプロモーター；YEp13から得られたLeu2遺伝子由来のプロモーター；メタロチオネイン由来のプロモーター；SV40由来の初期または後期プロモーター、ポリオーマウイルス、アデノウイルスII、ウシ乳頭腫ウイルス、およびトリ肉腫ウイルス由来のプロモーターのような他のウイルスプロモーターが包含される。宿主細胞と適切なプロモーターとの組合せは当業者に公知であり、必要に応じて適切に選択され得る。

【0036】

発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによって形質転換体を得られる。この形質転換体を適当な条件で培養することにより、所望のアドレノメデュリンを得ることができる。

【0037】

アドレノメデュリンの化学合成は、当該技術分野で公知の方法で行われ得る。例えば、ペプチド合成機による固相法で合成され得る。C末端がアミド化されているペプチドは、ベンズヒドリルアミンレジンを用いて、ペプチド合成機にてC末端アミノ酸から順次N末端アミノ酸まで標準的なDCC/HOBtで縮合させ、得られたペプチドレジンから標準的な開裂法（トリフルオロメタンスルホン酸法）で、目的とするペプチドを切り出して、作製し得る。

【0038】

C末端がアミド化されたアドレノメデュリンを得るためには、宿主内で発現させて得られたペプチドのC末端のカルボキシル基を、化学的にアミド化するか、または目的とするアミノ酸配列のC末端にGlyが付加したペプチドを調製し、これに前述のC末端アミド化酵素を作用させてアミド化すればよい。

【0039】

あるいは、アドレノメデュリンのC末端にGlyが付加したペプチドは、前述の通り、生体内のC末端アミド化酵素の作用によってC末端がアミド化され得る。

【0040】

ジスルフィド結合は、例えば、空気酸化または適当な酸化剤でペプチドを酸化することにより形成させ得る。ジスルフィド結合の $-CH_2-CH_2-$ 結合への置換は、周知の方法（文献16）により行い得る。一般に、ジスルフィド結合を $-CH_2-CH_2-$ 結合に置換することにより、ジスルフィド結合の開裂がなくなり、タンパク質が安定化する。

【0041】

以上のようにして得られたアドレノメデュリンが選択的な子宮筋収縮抑制作用を有することは、当該分野で公知の、子宮筋収縮作用についてのアッセイ方法を用いて行われ得る。アッセイ方法の例としては、エストロゲンで前処理した雌ラットの子宮を用いる方法、発情前期または発情期の処女の雌ラットの子宮を用いる方法、妊娠中、分娩中、あるいは分娩後の雌ラットの子宮を用いる方法などが挙げられる。エストロゲンで前処理した雌ラットの子宮を用いる場合、例えば、以下の条件で子宮筋収縮抑制作用をアッセイし得る：エストロゲン（例えば、 17β -エストラジオール）を投与した雌ラットから子宮を摘出し、これをいくつかに切断することにより子宮断片を得る。子宮断片の血管付着部を除去して、子宮切片を得る。得られた子宮切片を、リンゲル液などの緩衝液中に浸漬しながら、アイソメトリックトランスデューサーおよびアイソトニックトランスデューサーなどの測定装置を用いて、子宮筋の収縮を継続的に調べる。自動収縮をする子宮筋の律動が一定になったところで、またはブラジキニン、オキシトシン、もしくはプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ を添加した後に、溶液に被験ペプチドを添加し、子宮筋の収縮の変化を調べる。被験ペプチドの存在下および非存在下で子宮筋を収縮させて、収縮のレベルを比較することにより、ペプチドの子宮筋収縮抑制作用が判断される。このようにして子宮筋の自動収縮、またはブラジキニン、オキシトシン、もしくはプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ による子宮筋の収縮に対する被験ペ

プチドの作用を決定する。子宮筋の自動収縮またはブラジキニンによる子宮筋の収縮は抑制するが、オキシトシンもしくはプロスタグランジン $F_2\alpha$ による子宮筋の収縮は抑制しない被験ペプチドは、選択的な子宮筋収縮抑制作用を有すると判断される。

【0042】

III. 子宮筋収縮抑制用組成物の調製

本発明の組成物は、有効量のアドレノメデュリンに加えて、当業者に公知の任意の賦形剤を含有し得る。賦形剤の例としては、乳糖、コーンスターチ、ステアリン酸マグネシウム、ミョウバンなどが挙げられる。

【0043】

本発明の組成物は、当該分野で公知の方法に従って調製され得る。

【0044】

本発明の組成物は、任意の形状であり得る。本発明の組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤のような固体；または水溶液および懸濁液のような液体であり得る。本発明の組成物を錠剤として経口投与する場合、通常、乳糖、コーンスターチ、およびステアリン酸マグネシウムのような賦形剤が使用され得る。本発明の組成物をカプセル剤として経口投与する場合、通常、乳糖および乾燥コーンスターチのような賦形剤が使用され得る。水性懸濁液として経口投与するためには、アドレノメデュリンを乳濁液または懸濁液と組み合わせて使用し得る。水性懸濁液は、必要に応じて、甘味剤および香料を含有し得る。本発明の組成物を筋肉内、腹腔内、皮下、および静脈内注射する場合は、滅菌した溶液にアドレノメデュリンを溶解させて緩衝液を調製し、pHを適切な値に調節する。本発明の組成物を静脈内投与する場合は、組成物は等張であることが好ましい。

【0045】

IV. 子宮筋収縮抑制用組成物の投与

本発明の組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing社、Easton、P Aに記載されているような従来のペプチドの処方物の形で投与され得る。例えば、本発明の組成物は、経口投与；静脈投与、筋肉注射、腹腔内注射、および皮下

注射のような非経口投与により投与され得る。これらのペプチドを羊水中へ補充することも可能である。好ましくは、これらのペプチドは、注射によって投与され得る。

【0046】

本発明の組成物を、ヒトに投与する場合、1日あたりの用量は、通常、患者の症状、重篤度、感受性に対する個体差、体重、年齢などを考慮して、当業者によって適切に決定され得る。本発明の組成物は、1日1回投与されてもよいし、1日数回に分けて投与されてもよい。

【0047】

【実施例】

以下、本発明の子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための薬としてのアドレノメデュリンの作用についてさらに具体的に説明する。本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。本実施例で用いたアドレノメデュリンは、配列番号6の1位のTyrから50位のTyrまでのアミノ酸配列からなる、合成ペプチドである（Peptide Institute, Inc. より入手）。

【0048】

（実施例1：雌ラット子宮の自動収縮に対するアドレノメデュリンの効果）

10～12週齢の雌ラットに、0.2mlの30%エタノール中1μgの17β-エストラジオールを皮下注射した。

【0049】

翌日、このラットの頭部を強打することにより、屠殺した。次いでこのラットを断頭し、瀉血し、そして子宮を摘出した。摘出した子宮を、a～dの4つの部分に切断し（図1（A））、次いで、各断片から血管の付着部側を切除することにより、子宮切片（図1（B））を得た。

【0050】

アドレノメデュリンのラット子宮に対する影響を、アイソトニックトランスデューサーTD-112S（日本光電社製）を1g張力で用いて子宮切片の収縮を測定することにより調べた。

【0051】

まず、子宮切片を、30 mlのグルコース添加改変クレブスーリンゲル重炭酸溶液 (Modified Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) solution with glucose) (以下、単に「改変KRB溶液」という。) 中に浸したまま、アイソトニックトランスデューサーに取り付けた。改変KRB溶液の組成は、以下の通りである: 122 mM NaCl、26 mM NaHCO₃、5 mM KCl、1 mM MgSO₄ · 7H₂O、0.03 mM EDTA-2Na、2.4 mM CaCl₂、および11 mM グルコース; pH 7.4)。

【0052】

子宮筋収縮を継続的に測定した。子宮筋の自動的律動が一定になるのを確認した後、 10^{-4} M アドレノメデュリン (実験サンプル) または蒸留水 (コントロールサンプル) を、それぞれ、30 μ l ずつ、グルコース添加改変KRB溶液に添加し、アドレノメデュリンの濃度を100 nMとした。アドレノメデュリンまたは蒸留水の添加から30分後、4.5 MのKClを300 μ l 添加してKCl濃度を45 mMとした。

【0053】

結果を、図2 (a) ~ (d) に示す。ここで、図2の (a) ~ (d) は、それぞれ図1 (A) の a ~ d の部分の子宮切片を用いて得られた結果に対応する。図2 (a) および (b) はコントロールを、図2 (c) および (d) は100 nM アドレノメデュリン添加の結果を示す。それぞれの図の左側の矢印は、蒸留水またはアドレノメデュリンを添加した時点を示す。それぞれの図の右側の矢印は、45 mMのKClを添加した時点を示す。

【0054】

図2 (a) および (b) に示されるように、子宮筋の自動収縮は、蒸留水の添加の影響を受けなかった。一方、アドレノメデュリンを添加した場合、子宮筋の自動収縮が顕著に抑制された (図2 (c) および (d))。また、45 mMのKClの添加により、コントロール添加サンプルでもアドレノメデュリン添加サンプルでも強い収縮が起きたことから、アドレノメデュリンの添加が、子宮平滑筋

細胞の脱分極によって生じる電位依存性Caチャンネルの活性化による筋収縮には影響を与えないことがわかった。

【0055】

なお、アイソメトリックトランスデューサーを用いて同じ実験を行ったところ、上記と同じ結果が得られた（データは示さず）。

【0056】

（実施例2：雌ラット子宮に対するアドレノメデュリンの濃度依存的効果）

実施例1と同様に子宮切片を調製し、改変KRB溶液中でアイソトニックトランスデューサーにとり付け、子宮筋の収縮を継続的に測定した。子宮筋の自動的律動が一定になるのを確認した後、 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 7×10^{-6} 、 2×10^{-5} 、および 7×10^{-5} M アドレノメデュリン（実験サンプル）、または蒸留水（コントロールサンプル）を、それぞれ、最初の添加を0分として、5分後、12分後、22分後、および32分後に改変KRB溶液に30μlずつ添加して、アドレノメデュリンの濃度を各々1、3、10、30、および100nMとした。次いで、アドレノメデュリンまたは蒸留水の最初の添加から45分後、4.5MのKClを300μl添加してKClの濃度を45mMとした。

【0057】

結果を、図3（a）～（c）に示す。ここで、図3の（a）～（c）は、それぞれ図1（A）のb～dの部分の子宮切片を用いて得られた結果に対応する。図3（a）および（b）は、1～100nMの各種濃度のアドレノメデュリン添加の結果を、そして図3（c）はコントロールを示す。それぞれの図の矢印は、アドレノメデュリン、蒸留水、またはKClを添加した時点を示す。

【0058】

図3（a）および（b）に示されるように、子宮筋の自動収縮は、アドレノメデュリンの添加により、濃度依存的に抑制されることがわかった。

【0059】

（実施例3：アドレノメデュリンによるブラジキニン誘導性子宮筋収縮の抑制

）

実施例1と同様に子宮切片を調製し、改変KRB溶液中でアイソトニックトラ

ンスデューサーにとり付け、10 nMブラジキニン (Peptide Institute, Inc.) を改変KRB溶液に添加した時点から、子宮筋の収縮を継続的に測定した。ブラジキニンの添加の20分後、100 nMアドレノメデュリンまたは蒸留水をさらに添加した。

【0060】

結果を、図4 (a) および (b) に示す。ここで、図4の (a) および (b) は、それぞれ図1 (A) のaおよびcの部分の子宮切片を用いて得られた結果に対応する。図4 (a) は、100 nMアドレノメデュリン添加の結果を、そして図4 (b) は蒸留水添加の結果を示す。それぞれの図の矢印は、ブラジキニン、アドレノメデュリン、または蒸留水を添加した時点を示す。

【0061】

図4 (a) および (b) に示されるように、ブラジキニンにより誘導される子宮筋の収縮は、アドレノメデュリンの添加により抑制された。

【0062】

(実施例4：オキシトシンまたはプロスタグランジン $F_2\alpha$ による収縮に対するアドレノメデュリンの効果)

8～12週齢の雌ラットを用い、実施例1と同様にして子宮切片を調製した。

【0063】

次いで、37℃にて、95% O_2 / 5% CO_2 を通気した、30 mlの改変KRB溶液を満たした組織チャンバー中に子宮切片を入れ、実施例1と同様に子宮切片の収縮を測定した。40分間の平衡化後、子宮切片を、1 μ M AM [22-52] または1 μ M CGRP [8-37] の非存在下または存在下で15分間ブレインキュベーションし、次いでAMを組織チャンバー中の改変KRB溶液に添加することによりAMの濃度を1～100 nMに徐々に増加させながらAMに曝露した。

【0064】

17 β -エストラジオール注射を与えていないラットを用いる別の実験では、10 nM ブラジキニン、1 nM オキシトシン、または1 μ M $PGF_2\alpha$ による子宮収縮に対する100 nM AMの効果、1 μ M AM [22-52]

または $1\ \mu\text{M}$ CGRP [8-37] の非存在下または存在下で試験した。

【0065】

いずれの測定においても、 $45\ \text{mM}$ KCl分極により子宮を最終的に収縮させ、子宮の応答を確認した。結果を図6 (a) ~ (f) および図7 (a) ~ (e) に示す。

【0066】

エストロゲンの一種である 17β -エストラジオールで処理したラットから単離した子宮切片は、律動様式で自動収縮した (図6 (a) ; ここでは、AM溶液の代わりに蒸留水を添加している)。濃度を徐々に増すように ($1\sim 100\ \text{nM}$) AMをチャンバーに加えることにより、自動収縮は、濃度依存的に抑制された ($\text{IC}_{50} = 23\ \text{nM}$) (図6 (b) および (c))。AMの抑制効果は、 $100\ \text{nM}$ AMにより子宮筋が完全に弛緩した場合でさえも、改変KRB溶液を洗浄交換しAMを除去することにより可逆的であった (図6 (c))。 $1\ \mu\text{M}$ AM [22-52] または $1\ \mu\text{M}$ CGRP [8-37] のいずれかを予め添加することは、それ自体では効果が無かったが、 $1\sim 100\ \text{nM}$ AMの添加による収縮抑制効果をほぼ完全に妨げた (図6 (d) および (e))。図6 (f) は、図6 (b)、(d)、および (e) の結果を比較したグラフである。

【0067】

エストロゲン処理していないラットから子宮切片を調製した場合、これらは、種々の間隔および振幅で自動収縮した。図7 (a)、(b)、および (c) に示すように、 $1\ \text{nM}$ オキシトシン、 $1\ \mu\text{M}$ $\text{PGF}_2\alpha$ 、または $10\ \text{nM}$ ブラジキニンは、いずれも、収縮を顕著に刺激した。 $100\ \text{nM}$ のAMは、オキシトシン (図7 (a)) または $\text{PGF}_2\alpha$ (図7 (b)) により引き起こされる収縮に対して、ほとんど影響を与えなかった。他方、ブラジキニンによる収縮は、自動収縮を完全に抑制し得る濃度である $100\ \text{nM}$ のAMにより完全にブロックされた (図7 (c))。ブラジキニンによる収縮に対するAMの抑制効果は、AM [22-52] またはCGRP [8-37] を予め添加することにより消失した (図7 (d) および (e))。

【0068】

(実施例の考察)

本発明者の知る限り、本実施例は、AMが、ラット子宮の自律的な自動収縮を濃度依存的に可逆的に抑制することを初めて実証した。さらに、AMは、ブラジキニンによる収縮は抑制したが、オキシトシン、PGF₂ α あるいは、高K刺激による収縮には影響しなかった。このことは、AMの作用が、子宮平滑筋を直接的に弛緩させるものでなく、自動的収縮、あるいは、ブラジキニンによる収縮の発生機構を選択的に抑制していることを示唆する。

【0069】

本実施例において、AMによる子宮収縮抑制作用は、AMレセプターに対するアンタゴニストであるAM [22-52] と、CGRPレセプターに対するアンタゴニストであるCGRP [8-37] の両者でブロックされた。このことより、AMの作用は、AMレセプターとCGRPレセプターの両者を介して発現すると考えられる。AMの作用がCGRP [8-37] によってブロックされることに関しては、本実施例以外にも、単離されたラット腸間膜血管系においてAMの血管拡張作用を、CGRP [8-37] がブロックする（文献17）、ラット脳室へのAM投与による心拍数および血圧の上昇を、AM [22-52] あるいはCGRP [8-37] がブロックする（文献18）などの報告がある。また、ラット子宮を用いた結合実験において、AMは、¹²⁵I-AM結合、¹²⁵I-CGRP結合の両者を置換しうる、すなわち、AMは、AMの結合部位だけでなく、CGRPの結合部位にも結合しうるということが報告されている（文献7）。これらの知見は、本実施例で得られた結果を裏付けるものである。

【0070】

子宮におけるAM蛋白、AM遺伝子の発現は、AMが発見された副腎髄質における発現のレベルに匹敵して多い（文献7；文献3）。ラットおよびヒトの子宮で、AMが発現しているのは、子宮平滑筋組織より、むしろ子宮内膜組織であることが報告されている。このことより、子宮内膜で産生されたAMが、パラクリン因子として子宮平滑筋に作用してものと推測される。

【0071】

さらに、AMによる子宮収縮抑制作用の臨床的な意義について考察する。

【0072】

妊娠子宮において、AMの発現量は非妊娠時の約1.8～約4.5倍、 ^{125}I -AM結合量は約10倍、 ^{125}I -CGRP結合量は約4倍といずれも増加するが（文献7；文献4；文献19）、CGRPの発現量は、検出限界以下に減少することが報告されている（文献7）。これらの知見と、本実施例で得られた「AMが、AMレセプターおよびCGRPレセプターの両者を介して子宮収縮を抑制する」との結果をあわせると、妊娠子宮においては、発現が増加したAMが、子宮収縮を抑制することにより、妊娠の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

【0073】

また、本実施例において、AMは、ブラジキニンによる収縮は抑制したが、オキシトシンおよび $\text{PGF}_2\alpha$ による収縮は抑制しなかった。一般に、オキシトシンおよび $\text{PGF}_2\alpha$ による収縮は、分娩において重要な役割を担うとされている。一方、ブラジキニンによる収縮については、その生理的、あるいは病態生理的な意義は、未だ不明であるものの、本来、ブラジキニンが炎症反応によって局所で産生される炎症性のメディエーターである（文献20）ことから、妊娠子宮における異常な増加が早産、流産を引き起こす可能性が示唆されている（文献1）。したがって、AMは、オキシトシンおよび $\text{PGF}_2\alpha$ による正常分娩時の収縮は阻害することなく、ブラジキニンによる異常収縮のみを選択的に抑制することによって、流早産を防止し、妊娠を維持するように働いている可能性が示唆される。

【0074】

上記の結果をまとめると、非妊娠ラットの単離した子宮切片において、アドレノメデュリン（AM）は、自動定期収縮を濃度依存的に抑制した（ $\text{IC}_{50} = 23 \text{ nM}$ ）。AMの抑制効果は、CGRPレセプターについての推定アンタゴニストであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド[8-37]（CGRP[8-37]）によっても、AMレセプターの推定アンタゴニストであるAM[22-52]のいずれによっても、完全に防止された。AMはまた、ブラジキニンによる子宮収縮を減衰させた。ブラジキニンによる子宮収縮は、CGRP[8-37]または

AM [22-52] によりブロックされる。一方、AMは、オキシトシンまたはプロスタグランジン $F_2\alpha$ による収縮応答には抑制効果がない。これらの結果は、AMが子宮筋の自動収縮およびブラジキニンによる子宮筋の収縮を選択的に抑制することを示す。

【0075】

【発明の効果】

本発明により、アドレノメデュリンを含有する、子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための組成物が提供される。この組成物は、早産および流産を予防するため、帝王切開時に分娩を停止するため、ならびに月経困難症を治療するために有用である。

【0076】

【表1】

文献

1. Schreyら, Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids (1992) 45:137-142
2. Kitamuraら, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1993) 192:553-560
3. Cameronら, Endocrinology (1998) 139:2253-2264
4. Makinoら, Eur. J. Pharmacol. (1999) 371:159-167
5. Minegishiら, Mol. Hum. Reprod. (1999) 5:767-770
6. Dilorioら, Eur. J. Endocrinol. (1999) 140:201-206
7. Uptonら, Endocrinology (1997) 138:2508-2514
8. Hataら, Lancet (1997) 350:1600
9. Marinoniら, Obstet. Gynecol. (1999) 93:964-967
10. Anouarら, Arch. Pharmacol. (1998) 357:446-453
11. 水野, 生化学第61巻, 第12号, 1435~1461頁(1989))
12. Changら, Nature (1977) 198, 1056)
13. Goeddelら, Nucleic Acids Res. (1980) 8:4057)
14. Shimatake, Nature (1981) 292:128)
15. Hitzemanら, J. Biol. Chem. (1980) 255:2073)
16. O. Kellerら, Helv. Chim. Acta (1974) 57:1253)
17. Nukiら, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1993) 196:245-251
18. Saitaら, Am. J. Physiol. (1998) 274:R979-R984
19. Dongら, Am. J. Obstet. Gynecol. (1998) 179:497-506
20. DeLaら, Am. J. Physiol. (1991) 260:G213-219

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shionogi & Co., Ltd

<120> Drugs for contraction suppression of myometrium

<130> J199137580

<140> JP P1999-177548

<141> 1999-06-23

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1457

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (165)..(719)

<220>

<221> mat peptide

<222> (447)..(602)

<400> 1

ggcacgagct ggatagaaca gctcaagcct tgccacttcg ggcttctcac tgcagctggg 60

cttggacttc ggagttttgc cattgccagt gggacgtctg agactttctc cttcaagtac 120

ttggcagatc actctcttag cagggctctgc gcttcgcagc cggg atg aag ctg gtt 176

Met Lys Leu Val

tcc gtc gcc ctg atg tac ctg ggt tcg ctc gcc ttc cta ggc gct gac 224

Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe Leu Gly Ala Asp

-90 -85 -80 -75

acc gct cgg ttg gat gtc gcg tcg gag ttt cga aag aag tgg aat aag 272

Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys

-70 -65 -60

tgg gct ctg agt cgt ggg aag agg gaa ctg cgg atg tcc agc agc tac 320

Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr

-55 -50 -45

ccc acc ggg ctc gct gac gtg aag gcc ggg cct gcc cag acc ctt att 368

Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile

-40 -35 -30

cgg ccc cag gac atg aag ggt gcc tct cga agc ccc gaa gac agc agt 416

Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser

-25 -20 -15

ccg gat gcc gcc cgc atc cga gtc aag cgc tac cgc cag agc atg aac 464

Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn

-10 -5 -1 1 5

aac ttc cag ggc ctc cgg agc ttt ggc tgc cgc ttc ggg acg tgc acg 512

Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr

10

15

20

gtg cag aag ctg gca cac cag atc tac cag ttc aca gat aag gac aag 560

Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys

25

30

35

gac aac gtc gcc ccc agg agc aag atc agc ccc cag ggc tac ggc cgc 608

Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg

40

45

50

cgg cgc cgg cgc tcc ctg ccc gag gcc ggc ccg ggt cgg act ctg gtg 656

Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu Val

55

60

65

70

tct tct aag cca caa gca cac ggg gct cca gcc ccc ccg agt gga agt 704

Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser

75

80

85

gct ccc cac ttt ctt taggatttag gcgcccatgg tacaaggaat agtcgcgcaa 759

Ala Pro His Phe Leu

90

gcatcccgtc ggtgcctccc gggacgaagg acttcccagc cgggtgtgggg accgggctct 819

gacagccctg cggagaccct gagtccggga ggcaccgtcc ggcggcgagc tctggctttg 879

caagggccccc tccttctggg ggcttcgctt ccttagcctt gctcaggtgc aagtccccca 939

gggggcgggg tgcagaagaa tccgagtgtt tgccaggctt aaggagagga gaaactgaga 999

aatgaatgct gagacccccg gagcaggggt ctgagccaca gccgtgctcg cccacaaact 1059

gattttctcac ggcgtgtcac cccaccaggg cgcaagcctc actattactt gaactttcca 1119

aaacctaag aggaaaagtg caatgcgtgt tgtacataca gaggtaacta tcaatattta 1179

agtttgttc tgtcaagatt tttttgttaa cttcaaata agagatattt ttgtacgtta 1239

tatattgtat taagggcatt ttaaaagcaa ttatattgtc ctcccctatt ttaagacgtg 1299

aatgtctcag cgaggtgtaa agttgttcgc cgcgtggaat gtgagtgtgt ttgtgtgcat 1359

gaaagagaaa gactgattac ctctgtgtg gaagaaggaa acaccgagtc tctgtataat 1419

ctattttacat aaaatgggtg atatgcgaac agcaaacc 1457

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe

-90

-85

-80

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys

-75

-70

-65

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met

-60

-55

-50

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala

-45

-40

-35

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro

-30

-25

-20

-15

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg

-10

-5

-1 1

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe

5

10

15

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr

20

25

30

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln

35

40

45

50

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly

55

60

65

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro

70

75

80

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu

85

90

<210> 3

<211> 1493

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (148)..(711)

<220>

<221> mat peptide

<222> (430)..(585)

<400> 3

gcggaacagc tcgagccttg ccacctctag tttcttacca cagcttggac gtcgggggttt 60

tgccactgcc agagggacgt ctacagacttc atcttcccaa atcttggcag atcacccct 120

tagcagggtc tgcacatctc agccggg atg aag ctg gtt ccc gta gcc ctc atg 174

Met Lys Leu Val Pro Val Ala Leu Met

-90

tac ctg ggc tcg ctc gcc ttc ctg ggc gct gac aca gct cgg ctc gac 222

Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp

-85

-80

-75

-70

gtg gcg gca gag ttc cga aag aaa tgg aat aag tgg gct cta agt cgt 270

Val Ala Ala Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg

-65

-60

-55

gga aaa aga gaa ctt cgg ctg tcc agc agc tac ccc acc ggg atc gcc 318

Gly Lys Arg Glu Leu Arg Leu Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Ile Ala

-50

-45

-40

gac ttg aag gcc ggg cct gcc cag act gtc att cgg ccc cag gat gtg 366

Asp Leu Lys Ala Gly Pro Ala Gln Thr Val Ile Arg Pro Gln Asp Val

-35

-30

-25

aag ggc tcc tct cgc agc ccc cag gcc agc att ccg gat gca gcc cgc 414

Lys Gly Ser Ser Arg Ser Pro Gln Ala Ser Ile Pro Asp Ala Ala Arg

-20

-15

-10

atc cga gtc aag cgc tac cgc cag agt atg aac aac ttc cag ggc ctg 462

Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu

-5

-1 1

5

10

cgg agc ttc ggc tgt cgc ttt ggg acg tgc acc gtg cag aag ctg gcg 510

Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala

15

20

25

cac cag atc tac cag ttc acg gac aaa gac aag gac ggc gtc gcc ccc 558

His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Gly Val Ala Pro

30

35

40

cgg agc aag atc agc ccc cag ggc tac ggc cgc cgg cgc cga cgc tct 606
Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser

45

50

55

ctg ccc gaa gcc agc ctg ggc cgg act ctg agg tcc cag gag cca cag 654
Leu Pro Glu Ala Ser Leu Gly Arg Thr Leu Arg Ser Gln Glu Pro Gln

60

65

70

75

gcg cac ggg gcc ccg gcc tcc ccg gcg cat caa gtg ctc gcc act ctc 702
Ala His Gly Ala Pro Ala Ser Pro Ala His Gln Val Leu Ala Thr Leu

80

85

90

ttt agg att taggcgccta ctgtggcagc agcgaacagt cgcgcattgca 751
Phe Arg Ile

tcatgccggc gcttcctggg gcggggggct tcccggagcc gagcccctca gcggctgggg 811

cccgggcaga gacagcattg agagaccgag agtccgggag gcacagacca gcggcgagcc 871

ctgcattttc aggaaccgt cctgcttgga ggcagtgttc tcttcggctt aatccagccc 931

gggtccccgg gtgggggtgg aggggtgcaga ggaatccaaa ggagtgtcat ctgccaggct 991

cacggagagg agaaactgcg aagtaaattgc ttagaccccc aggggcaagg gtctgagcca 1051

ctgccgtgcc gccacaaaac tgatttctga aggggaataa cccaacagg gcgcaagcct 1111

cactattact tgaactttcc aaaacctaga gaggaaaagt gcaatgtatg ttgtatataa 1171

agaggtaact atcaatattt aagtttggtg ctgtcaagat tttttttgt aacttcaa 1231

atagagatat tttgtacgt tatatattgt attaaggga ttttaaaca attgtattgt 1291

tcccccccc tctattttta tatgtgaatg tctcagcgag gtgtaacatt gtttgctgcg 1351

cgaaatgtga gagtgtgtgt gtgtgtgtgc gtgaaagaga gtctggatgc ctctgggga 1411

agaagaaaac accatatctg tataatctat ttacataaaa tgggtgatat gcgaagtagc 1471

aaaccaataa actgtctcaa tg 1493

<210> 4

<211> 188

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 4

Met Lys Leu Val Pro Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe

-90

-85

-80

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ala Glu Phe Arg Lys

-75

-70

-65

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Leu

-60

-55

-50

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Ile Ala Asp Leu Lys Ala Gly Pro Ala

-45	-40	-35
Gln Thr Val Ile Arg Pro Gln Asp Val Lys Gly Ser Ser Arg Ser Pro		
-30	-25	-20
-15		
Gln Ala Ser Ile Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg		
-10	-5	-1 1
Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe		
5	10	15
Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr		
20	25	30
Asp Lys Asp Lys Asp Gly Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln		
35	40	45
50		
Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Ser Leu Gly		
55	60	65
Arg Thr Leu Arg Ser Gln Glu Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Ser		
70	75	80
Pro Ala His Gln Val Leu Ala Thr Leu Phe Arg Ile		
85	90	

<210> 5

<211> 1376

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

<222> (154)..(708)

<220>

<221> mat peptide

<222> (433)..(582)

<400> 5

tccagccttt accgctcctg gtttctcggc ttctcatcgc agtcagtcctt ggactttgcg 60

ggttttgccg ctgtcagaag gacgtctcgg actttctgct tcaagtgcct gacaactcac 120

cctttcagca gggatatcgga gcatcgctac aga atg aag ctg gtt tcc atc gcc 174

Met Lys Leu Val Ser Ile Ala

-90

ctg atg tta ttg ggt tcg ctc gcc gtt ctc ggc gcg gac acc gca cgg 222

Leu Met Leu Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg

-85

-80

-75

ctc gac act tcc tcg cag ttc cga aag aag tgg aat aag tgg gcg cta 270

Leu Asp Thr Ser Ser Gln Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu

-70

-65

-60

-55

agt cgt ggg aag agg gaa cta caa gcg tcc agc agc tac cct acg ggg 318

Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Gln Ala Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly
-50 -45 -40

ctc gtt gat gag aag aca gtc ccg acc cag act ctt ggg ctc cag gac 366
Leu Val Asp Glu Lys Thr Val Pro Thr Gln Thr Leu Gly Leu Gln Asp
-35 -30 -25

aag cag agc acg tct agc acc cca caa gcc agc act cag agc aca gcc 414
Lys Gln Ser Thr Ser Ser Thr Pro Gln Ala Ser Thr Gln Ser Thr Ala
-20 -15 -10

cac att cga gtc aaa cgc tac cgc cag agc atg aac cag ggg tcc cgc 462
His Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn Gln Gly Ser Arg
-5 -1 1 5 10

agc act gga tgc cgc ttt ggg acc tgc aca atg cag aaa ctg gct cac 510
Ser Thr Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Met Gln Lys Leu Ala His
15 20 25

cag atc tac cag ttt aca gac aaa gac aag gac ggc atg gcc ccc aga 558
Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Gly Met Ala Pro Arg
30 35 40

aac aag atc agc cct caa ggc tat ggc cgc cgg cgc cgg cgt tcc ctg 606
Asn Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu
45 50 55

cca gag gtc ctc cga gcc cgg act gtg gag tcc tcc cag gag cag aca 654
Pro Glu Val Leu Arg Ala Arg Thr Val Glu Ser Ser Gln Glu Gln Thr

60

65

70

cac tca gct cca gcc tcc ccg gcg cac caa gac atc tcc aga gtc tct 702
His Ser Ala Pro Ala Ser Pro Ala His Gln Asp Ile Ser Arg Val Ser
75 80 85 90

agg tta taggtgcggg tggcagcatt gaacagtcgg gcgagtatcc cattggcgcc 758
Arg Leu

tgcggaatca gagagcttcg caccctgagc ggactgagac aatcttgcag agatctgcct 818

ggctgcccct aggggaggca gaggaacca agatcaagcc aggctcacgt cagaaaccga 878

gaattacagg ctgatactct ctccgggcag gggctctgagc cactgccttg cccgctcata 938

aactggtttt ctacggggc atacggctca ttacttactt gaactttcca aaacctagcg 998

aggaaaagtg caatgcttgt tatacagcca aaggtaacta tcatatttaa gtttgttgat 1058

gtcaagaggt ttttttttt gtaacttcaa atatatagaa atatttttgt acgttatata 1118

ttgtattaag ggcattttta agcgattata ttgtcacctt cccctatttt aagaagtga 1178

tgtctcagca aggtgtaagg ttgtttggtt ccgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 1238

gtgtgtgtgt gtgtgtgtaa ggtggagagc gcctgattac cgcctgtgga tgaagaaaaa 1298

acattgtgtc ttctataatc tatttacata aaatatgtga tctgggaaaa agcaaacc 1358

taaactgtct caatgctg

1376

<210> 6

<211> 185

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 6

Met Lys Leu Val Ser Ile Ala Leu Met Leu Leu Gly Ser Leu Ala Val

-90

-85

-80

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Thr Ser Ser Gln Phe Arg Lys

-75

-70

-65

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Gln Ala

-60

-55

-50

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Val Asp Glu Lys Thr Val Pro Thr

-45

-40

-35

-30

Gln Thr Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Ser Thr Ser Ser Thr Pro Gln

-25

-20

-15

Ala Ser Thr Gln Ser Thr Ala His Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln

-10

-5

-1 1

Ser Met Asn Gln Gly Ser Arg Ser Thr Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys

5

10

15

Thr Met Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp

20

25

30

35

Lys Asp Gly Met Ala Pro Arg Asn Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly

40

45

50

Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Val Leu Arg Ala Arg Thr Val

55

60

65

Glu Ser Ser Gln Glu Gln Thr His Ser Ala Pro Ala Ser Pro Ala His

70

75

80

Gln Asp Ile Ser Arg Val Ser Arg Leu

85

90

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1（A）は、実施例において子宮切片を採取した子宮部位を示す模式図である。図1（B）は、調製した子宮切片の形状を示す模式図である。

【図2】 図2（a）は図1（A）のaの子宮切片に蒸留水を；図2（b）は図1（A）のbの子宮切片に蒸留水を；図2（c）は図1（A）のcの子宮切片に100nMアドレノメデュリンを；そして図2（d）は図1（A）のdの子宮切片に100nMアドレノメデュリンを添加した場合に子宮筋の収縮を測定した結果示すグラフである。

【図3】 図3（a）は図1（A）のbの子宮切片に1～100nMアドレノメデュリンを；図3（b）は図1（A）のcの子宮切片に1～100nMアドレノメデュリンを；そして図3（c）は図1（A）のdの子宮切片に蒸留水を添加した場合に子宮筋の収縮を測定した結果を示すグラフである。

【図4】 図4（a）は図1（A）のaの子宮切片にブラジキニンを添加し、次いで100nMアドレノメデュリンを添加した場合の子宮筋の収縮を、図4

(b)は図1(A)のbの子宮切片にブラジキニンを添加し、次いで蒸留水を添加した場合に、子宮筋の収縮を測定した結果を示すグラフである。

【図5】 ヒト褐色細胞腫由来のアドレノメデュリンのアミノ酸配列を示す図である。RE1からRE6は、このアミノ酸配列をアルギニルエンドペプチダーゼで切断した場合に生成される断片を示す。

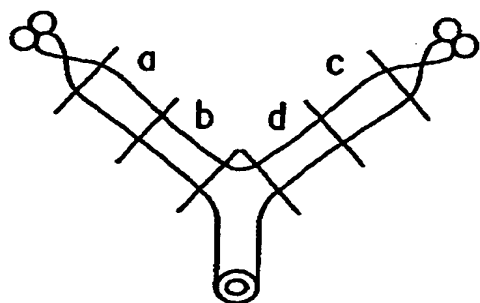
【図6】 AMによる子宮の自動収縮の濃度依存的抑制；AM[22-52]またはCGRP[8-37]による防止を示す図である。(a)～(e)は、と比較した、類似の結果を有する5つの別々の実験からの代表的な記録である。
* $p < 0.05$ 、薬物なしでの応答（一因子分散分析）；[#] $p < 0.05$ 、AM単独と比較して（二因子分散分析）。

【図7】 AMによっては引き起こされるが、AM[22-52]またはCGRP[8-37]によるオキシトシンまたはPGF₂αの防止によっては引き起こされない、ブラジキニンによる子宮収縮の抑制を示す図である。(a)から(e)は、類似の結果を有する5回の別々の実験からの代表的な記録を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

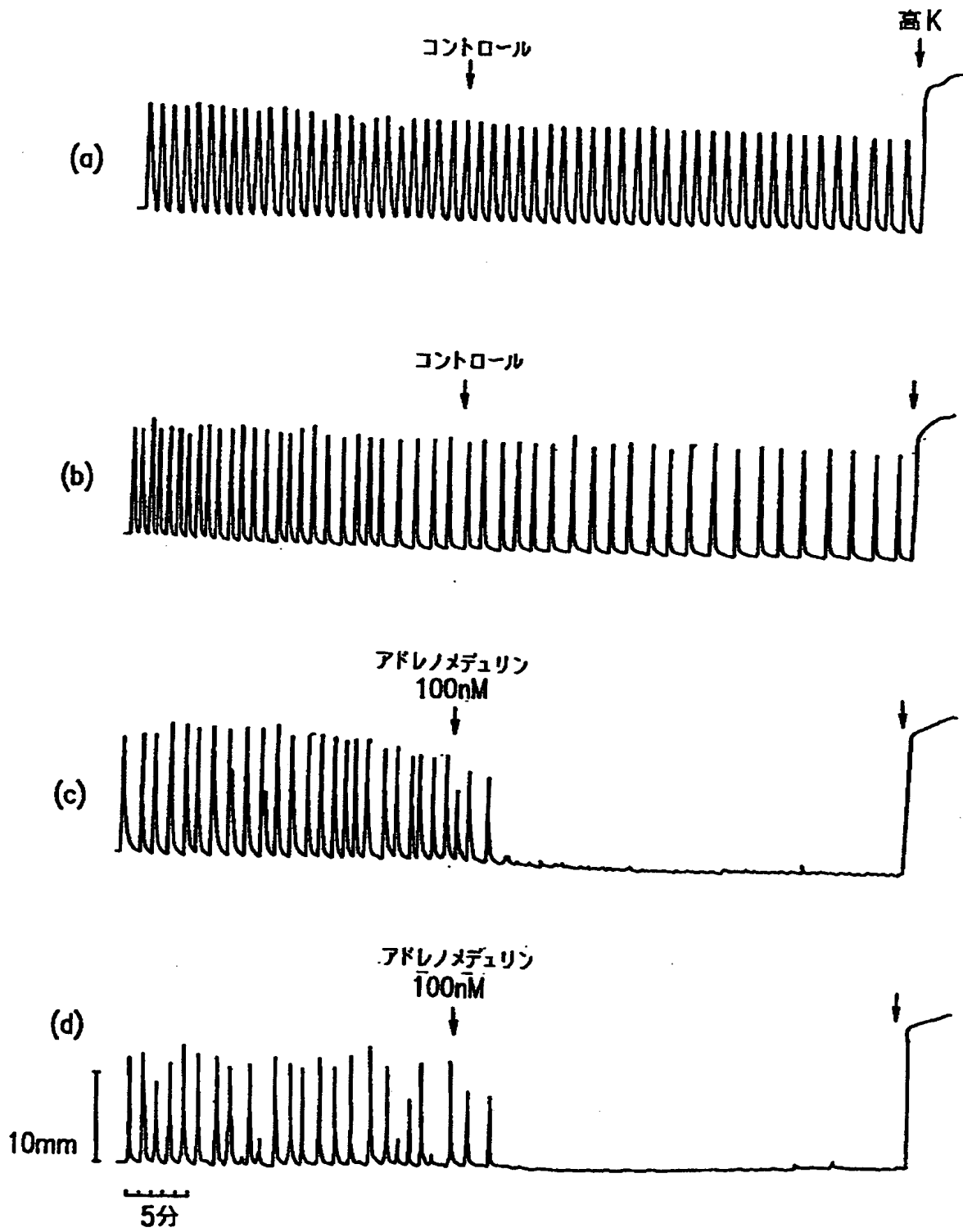
(A)



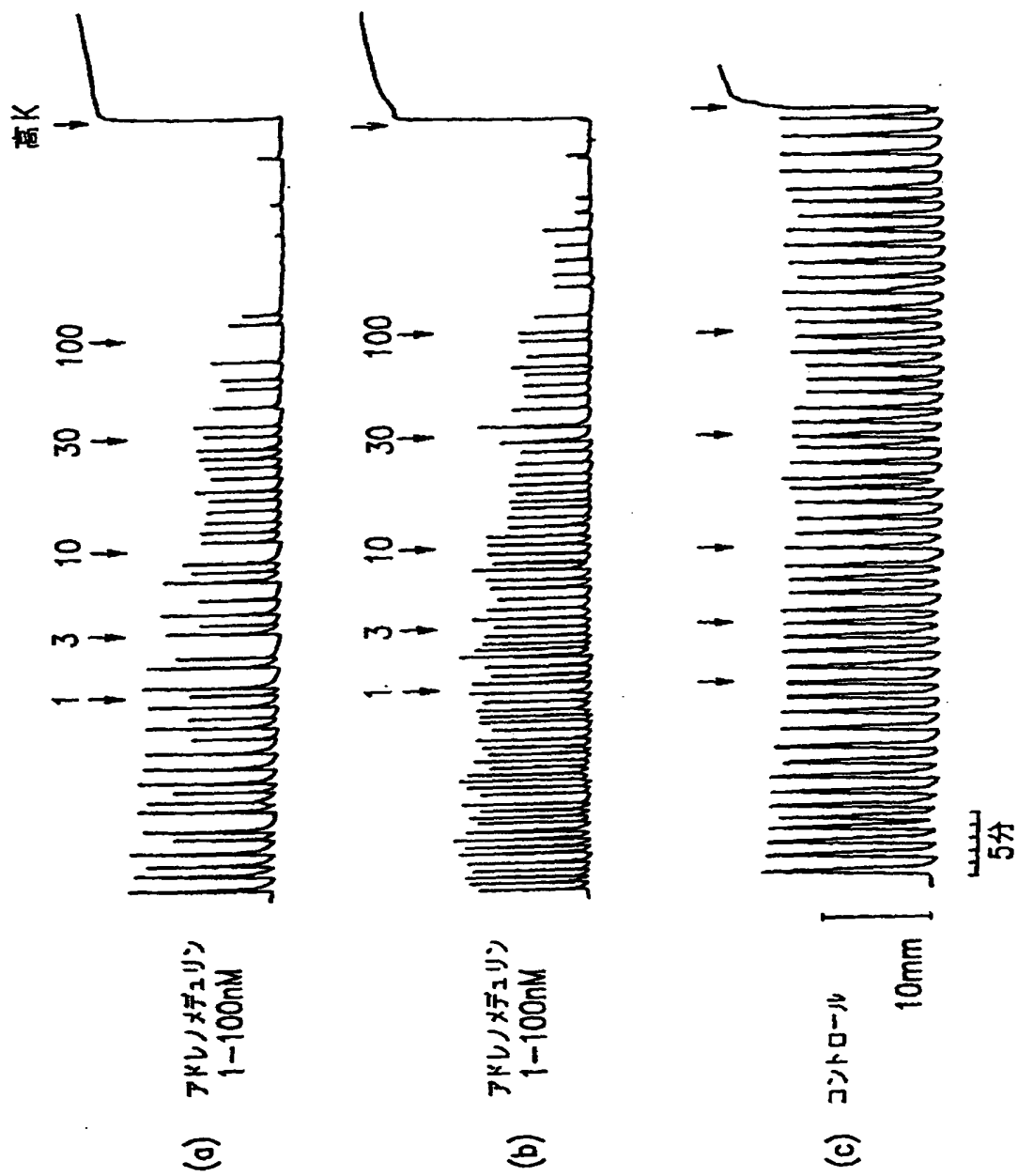
(B)



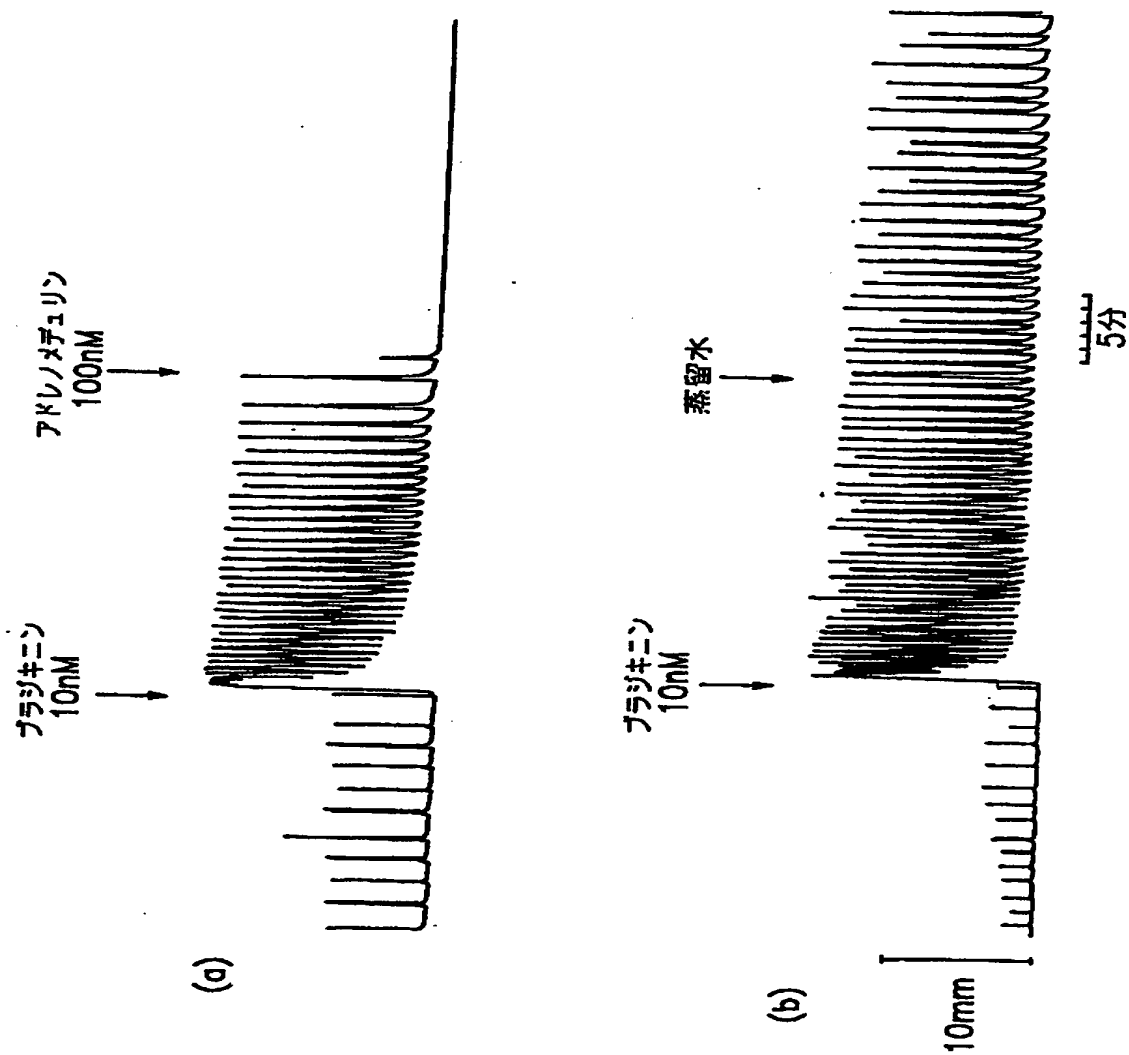
【図 2】



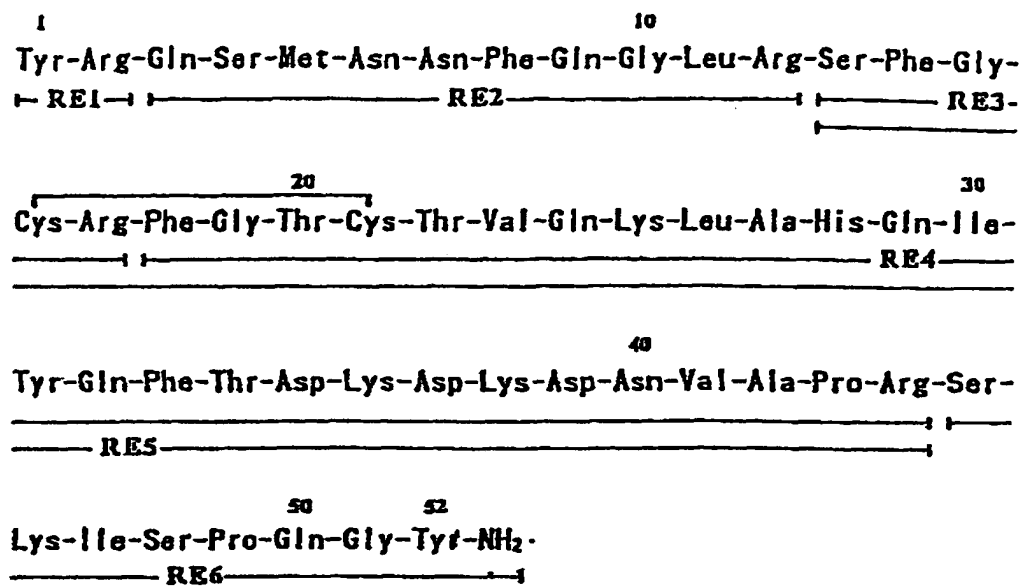
【図3】



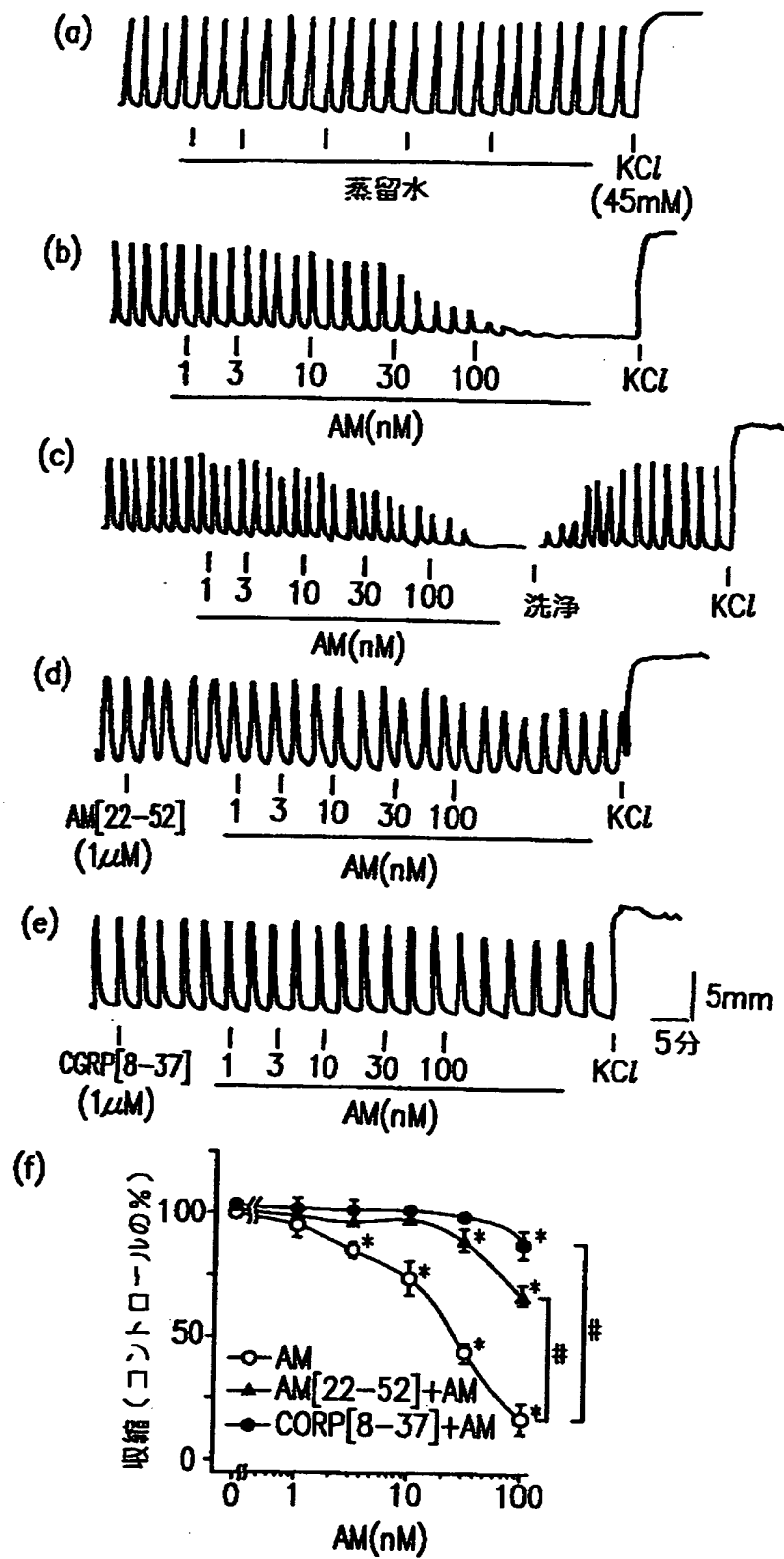
【図 4】



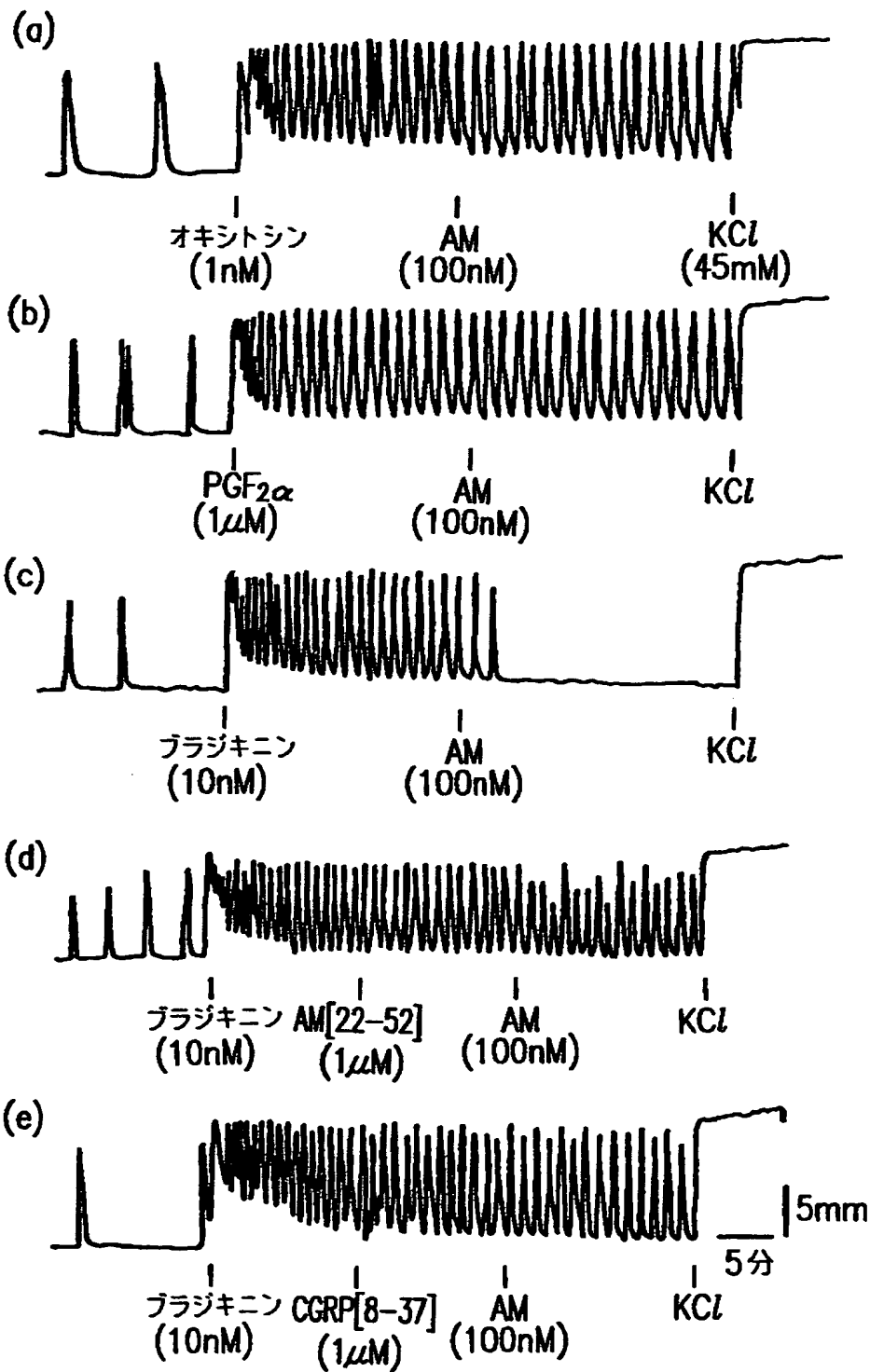
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 子宮筋の自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制する新規な薬剤を提供すること。

【解決手段】 アドレノメデュリンを含有する、子宮筋自動収縮またはブラジキニンによる収縮を選択的に抑制するための組成物。本発明の組成物は、早産を予防するため、流産を予防するため、帝王切開前に分娩を停止するため、または月経困難症を治療するために用いられ得る。

【選択図】 なし

特 2 0 0 0 - 0 7 9 1 7 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 9 2 6]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 3 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号

氏 名 塩野義製薬株式会社